

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 247481 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **443677**

(22) Data zgłoszenia: **2023.02.03**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.08.05 BUP 32/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.07.07 WUP 27/2025**

(51) MKP:

C12P 19/04 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:
STANISŁAW BIELECKI, Łódź, PL
ANNA MASEK, Łódź, PL
TERESA PANKIEWICZ, Łódź, PL
JOLANTA PŁOSZYŃSKA, Łódź, PL
DAWID LISOWSKI, Łódź, PL
STEFAN CICHOSZ, Zgierz, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska, Łódź, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania modyfikowanej bakteryjnej celulozy w formie bioskóry

PL 247481 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania modyfikowanej bakteryjnej celulozy (MBC) w formie bioskóry (BioS) jako kompozytu do zastosowań technicznych.

Celuloza bakteryjna jest polisacharydem złożonym z reszt D-glukopiranozy, połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Jest ona wytwarzana przez mikroorganizmy, takie jak bakterie z rodzaju *Rhizobium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhodobacter*, *Dikeya* i *Sarcina*, ale najwydajniejszymi producentami tego biopolimeru są bakterie z rodziny *Acetobacteraceae*, szczególnie z rodzaju *Komagataeibacter* (książka *Bacterial nanocellulose from biotechnology to bio-economy*, 2016, Elsevier ISBN: 978-0-444-63458-0, s.1–16). W hodowli stacjonarnej bakterii, celuloza bakteryjna jest gromadzona na powierzchni pożywki w formie błon o charakterze hydrożelu, składającego się prawie w 99% z wody i w 1% z czystej chemicznie celulozy. Błony celulozowe zbudowane są z nanowłókien o średnicy w zakresie 20–100 nm, o stopniu polimeryzacji 4000–10000, ułożonych w trójwymiarową sieć o wysokiej krystaliczności (książka *Bacterial nanocellulose from biotechnology to bio-economy*, 2016, Elsevier ISBN: 978-0-444-63458-0, s. 59–70). Celuloza bakteryjna znajduje zastosowanie w medycynie i farmacji, kosmetyce, ochronie środowiska, elektronice i akustyce, a także w przemyśle spożywczym, budowlanym, papierniczym. Wysokie zainteresowanie tym biomateriałem i szeroki potencjał aplikacyjny wynikają z jego unikatowych właściwości, przede wszystkim biokompatybilności i nietoksyczności, wysokiej zawartości wody, uporządkowanej krystalicznej struktury oraz wysokiej wytrzymałości mechanicznej (czasopismo *Cellulose*, 2016, t. 23, nr. 4, s. 2291–2314, książka *Bacterial nanocellulose from biotechnology to bio-economy*, 2016, Elsevier ISBN: 978-0-444-63458-0, s. 59–70). Parametry fizyko-chemiczne celulozy bakteryjnej oraz wydajność jej biosyntezy są ściśle uzależnione od szeregu czynników, takich jak szczep produkcyjny, metoda hodowli i rodzaj stosowanego bioreaktora, skład podłoża hodowlanego i w szczególności źródło węgla i azotu czy też dodatki stosowane do podłoża (czasopisma: *International Journal of Biological Macromolecules*, ISSN: 0141-8130, vol.187, 2021, s. 584–593, *Applied Microbiology and Biotechnology*, ISSN: 0175-7598, 2020. 10.1007/s00253-020-10671-3).

Znane są sposoby biosyntezy bakteryjnej celulozy w formie błon z zastosowaniem różnych szczepów bakterii octowych, jak również jej modyfikacje.

W opisie zgłoszenia patentowego EP2019382224A ujawniono sposób wytwarzania substytutu skóry zawierającego połączone ze sobą warstwę celulozy bakteryjnej (BC) oraz warstwę tworzywa sztucznego wybranego z grupy składającej się z poliestrów i polisacharydów lub ich kopolimerów. W rozwiązaniu tym do wytworzenia BC wykorzystuje się szczep bakterii *Komagataeibacter xylinus* i drożdży *Zygosaccharomyces rouxi* i *Candida*. Warstwę klejącą stanowi polichloropren lub poliuretan.

W opisie zgłoszenia patentowego WO1989US2355A opisano proces wytwarzania bionanocelulozy (BNC) przez mikroorganizmy zdolne do zmiany kierunku podczas syntezy celulozy, w hodowli statycznej. Pożywka hodowlana zawierała czynnik zakłócający krystalizację, w postaci glicerolu, glikolu polietylenowego lub karboksymetylocelulozy. Następnie na łąkach uzyskanej BNC osadzano poliakrylonitryl lub pokrywano materiałami magnetycznymi lub elektrycznymi bądź żywicami termoutwardzalnymi.

Z opisu zgłoszenia patentowego WO2022177528A1 znana jest metoda otrzymania kompozytu bakteryjnej celulozy przez nasycenie warstw bakteryjnej celulozy i dodanie napełniacza biopolimerowego, a następnie poddanie działaniom fizyko-chemicznym.

Z opisu zgłoszenia patentowego US 4942128A jest znane otrzymywanie modyfikowanej celulozy bakteryjnej, charakteryzującej się sprężystością i elastycznością w stanie suchym, w wyniku hodowli bakterii produkujących celulozę w podłożu suplementowanym pochodnymi celulozy, szczególnie karboksymetylocelulozą.

Z opisu patentowego US 4742164 znany jest sposób otrzymywania materiału łatwosztaltownego, o wysokiej dynamicznej wytrzymałości, zawierającego mikrofibryle celulozy bakteryjnej, polegający na poddaniu błon celulozowych maceracji i/lub ścisnaniu pod ciśnieniem i następnie suszeniu. W procesie rolowania tak otrzymanego materiału uzyskuje się jednoosiowe ułożenie włókien. Tak uzyskiwany materiał może być formowany w arkusze, wstęgi i płachty. Właściwości materiału modyfikuje się w zależności od przeznaczenia, poprzez inkorporację odpowiednich składników organicznych i nieorganicznych do jego struktury.

W opisie zgłoszenia patentowego US 5846213A ujawniono sposób produkcji celulozy bakteryjnej w hodowli bakterii z rodzaju *Acetobacter* w zbiorniku z mieszaniem i następnie rozpuszczeniu biomateriału w układzie rozpuszczalników dimetyloacetoamid/chlorek litu. Kolejno roztwór odlewa się na płaskiej

powierzchni i poddaje się regeneracji w kąpeli żelującej oraz wprowadza się humektant w procesie wymiany rozpuszczalników.

W czasopiśmie *Nanomaterials*, 2019 9(12), 1710 opisano metodę uzyskania nanokompozytu z modyfikowanej celulozy bakteryjnej z dodatkiem akrylowanego epoksydowanego oleju sojowego, glikolu polietylenowego, polidimetylosiloksanu oraz polimerów na bazie perfluorowęglowodorów.

W czasopiśmie *Microbial biotechnology*, 2019, 12(4), 650–661 opisano nanokompozyt na bazie BC impregnowanej dwoma handlowymi polimerami hydrofobowymi: persofital MS (polimetylosiloksan) i Baygard EFN (perfluorowęglowodor). Kompozyty były nieprzepuszczalne dla ciekłej wody, ale przepuszczalne dla pary wodnej.

Z opisu patentowego PL 241158 jest znany sposób otrzymywania nanocelulozy bakteryjnej w postaci błon o wysokiej rozciągliwości i o rozluźnionej strukturze, w drodze hodowli stacjonarnej szczepu bakterii z rodziny *Komagataeibacter hansenii* S11.

W sposobie tym ww. szczep bakterii *Komagataeibacter*, przechowywany w postaci zamrożonej w roztworze glicerolu, aktywuje się poprzez posiew redukcyjny na podłożu zestalonym 2% agarem, o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części aminobaku, 2,7 części dwuwodorofosforanu sodu, 1,15 części kwasu cytrynowego, 0,5 części siarczanu magnezu oraz inkubację w czasie 3 dni w temperaturze 30°C. Następnie jedną kolonię zaktywowanych bakterii przenosi się do płynnego podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego i po inkubacji w czasie dalszych 3 dni w temperaturze 30°C nagromadzoną biomasę wraz z wyrośniętą błoną celulozową przenosi się do podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego, stosując całość nagromadzonej biomasy na 100 ml podłoża i prowadzi inkubację w czasie 3 dni w temperaturze 30°C, po czym tak przygotowaną zawiesiną inokulum, po intensywnym jej wymieszaniu, zaszczepia się podłoże hodowli produkcyjnej o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części peptonu, 0,5 części MgSO₄ x 7H₂O, 2,7 części Na₂HPO₄, 1,15 części kwasu cytrynowego, wzbogacone dodatkowo kwasem askorbinowym dodanym w ilości 3%, korzystnie 0,5% wagowych masy podłoża, stosując 2–10% v/v inokulum w stosunku do objętości podłoża i prowadzi hodowlę produkcyjną w warunkach stacjonarnych, w czasie 5–12, korzystnie 7 dni w temperaturze 28–32°C i po zakończeniu hodowli produkcyjnej, błonę celulozową powstałą na powierzchni podłoża poddaje się oczyszczaniu polegającemu kolejno na płukaniu w gorącej wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% wodnym roztworem wodorotlenku sodu w temperaturze 100°C w czasie 1 godziny lub 1–2% wodnym roztworem tego wodorotlenku w czasie 20–24 godzin w temperaturze pokojowej, płukaniu w wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% roztworem wodnym kwasu octowego w czasie 20–24 godzin, ponownym płukaniu w wodzie wodociągowej i następnie w wodzie destylowanej.

Szczep bakterii *Komagataeibacter hamenii* S11 został zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk z siedzibą we Wrocławiu, pod numerem B/00222.

W Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie, pod numerem KKP 2062p został zdeponowany szczep bakterii *Komagataeibacter rhaeticus* K3 produkujący bakteryjną celulozę o zróżnicowanych właściwościach.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu wytwarzania modyfikowanej celulozy bakteryjnej (MBC) o właściwościach bioskóry, nadającej się do zastosowań technicznych.

Sposób wytwarzania modyfikowanej bakteryjnej celulozy (MBC) w formie bioskóry (BioS), z celulozy bakteryjnej otrzymanej w drodze hodowli stacjonarnej szczepu bakterii z rodzaju *Komagataeibacter*, w której szczep bakterii *Komagataeibacter*, przechowywany w postaci zamrożonej w roztworze glicerolu, aktywuje się poprzez posiew redukcyjny na podłożu zestalonym 2% agarem, o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części aminobaku, 2,7 części dwuwodorofosforanu sodu, 1,15 części kwasu cytrynowego, 0,5 części siarczanu magnezu oraz inkubację w czasie 3 dni w temperaturze 30°C, następnie przenosi się jedną kolonię zaktywowanych bakterii do 5 ml płynnego podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego i po inkubacji, w czasie dalszych 3 dni w temperaturze 30°C nagromadzoną biomasę wraz z tworzoną błoną celulozową przenosi się do 100 ml podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego i prowadzi inkubację w czasie 3 dni w temperaturze 30°C, po czym tak przygotowaną zawiesiną inokulum, po intensywnym jej wymieszaniu, zaszczepia się podłoże hodowli produkcyjnej o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części peptonu, 0,5 części MgSO₄ x7H₂O, 2,7 części Na₂HPO₄,

1,15 części kwasu cytrynowego, ewentualnie wzbogacone kwasem askorbinowym dodanym w ilości 3%, korzystnie 0,5% masy podłoża lub podłoże produkcyjne o składzie w częściach wagowych: 20–40 części przemysłowego produktu ubocznego lub odpadowego zawierającego niezbędną ilość cukrów, 8 części ekstraktu drożdżowego, 7 części peptonu, 1 część $MgSO_4 \times 7H_2O$, 4 części Na_2HPO_4 , 2 części kwasu cytrynowego, ewentualnie wzbogacone dodatkowo kwasem askorbinowym dodanym w ilości 5%, korzystnie 0,5% masy podłoża, stosując 2–10% v/v, korzystnie 5% v/v inokulum w stosunku do objętości podłoża i prowadzi hodowlę produkcyjną w warunkach stacjonarnych lub wstrząsanych, w czasie 5–12 dni, korzystnie 7 dni, w temperaturze 28–32°C, korzystnie 30°C i po zakończeniu hodowli produkcyjnej błonę celulozową powstałą na powierzchni podłoża poddaje się oczyszczaniu polegającemu kolejno na płukaniu w gorącej wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% wodnym roztworem wodorotlenku sodu w temperaturze 100°C w czasie 1 godziny lub 1–2% wodnym roztworem tego wodorotlenku w czasie 20–24 godzin w temperaturze pokojowej, płukaniu w wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% roztworem wodnym kwasu octowego w czasie 20–24 godzin, ponownym płukaniu w wodzie wodociągowej i następnie w wodzie destylowanej, **według wynalazku** polega na tym, że wytworzoną celulozę bakteryjną poddaje się modyfikacji przy użyciu oleju roślinnego, oleju roślinnego z dodatkiem barwnika spożywczego lub oleju roślinnego z dodatkiem aminokwasu, stosując 150 ml oleju, 5 ml roztworu barwnika o stężeniu 1–5% lub: 1–8 g aminokwasu na płat modyfikowanej celulozy o powierzchni 16 cm², metodą zanurzeniową, przesączania lub z wykorzystaniem ultradźwięków o częstotliwości 40 kHz, w temperaturze pokojowej w czasie 24 godzin, po czym po uformowaniu w płyty, suszy się w temperaturze 40°C, w czasie 24 godzin.

Korzystnie stosuje się szczep bakterii *Komagataeibacter hansenii* S11 lub *Komagataeibacter rhaeticus* K3, jako olej korzystnie olej lniany, rzepakowy, słonecznikowy, sojowy lub z pestek winogron, jako barwnik spożywczy korzystnie kurkuminę, zaś jako aminokwas korzystnie L-glutaminę.

Modyfikowana celuloza bakteryjna otrzymana sposobem według wynalazku, o właściwościach bioskóry, charakteryzuje się wysoką hydrofobowością oraz dużym stopniem elastyczności, daje się łatwo modelować do dowolnego kształtu, zachowuje nadany kształt po modyfikacji, jest biokompatybilna i biodegradowalna, stanowi barierę ochronną dla mikroorganizmów.

Celuloza o właściwościach bioskóry, otrzymana sposobem według wynalazku znajduje zastosowanie jako biomateriał w przemyśle budowlanym, transportowym, ogrodnictwym, skórzanym, modowym, a nadto do wytwarzania inteligentnych opakowań oraz w optoelektronice.

Sposób według wynalazku ilustrują poniższe przykłady z powołaniem się na rysunek, na którym Fig. 1 – Fig. 4 przedstawiają wyniki analiz właściwości celuloz otrzymanych w przykładach 1–4.

Przykład 1

Zawiesinę starterową przygotowano aktywując szczep *Komagataeibacter hansenii* S11, przechowywany w postaci zamrożonej w roztworze glicerolu, poprzez posiew redukcyjny na podłożu SH (podłożu Hestrin-Schram) zestalonym 2% agarem, o składzie: w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części aminobaku, 2,7 części dwuwodorofosforanu sodu, 1,15 części kwasu cytrynowego oraz 0,5 części siarczanu magnezu oraz inkubację w czasie 3 dni, w temperaturze 30°C. Następnie dokonano transferu 1 kolonii aktywowanego szczepu do 5 ml podłoża inokularnego, o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego i poddano inkubacji przez 3 dni w temperaturze 30°C. Nagromadzoną biomasę wraz z wyrośniętą błoną celulozową przeniesiono ilościowo do 100 ml podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego i inkubowano przez 3 dni w temperaturze 30°C. Tak przygotowana zawiesina drobnoustrojów, po intensywnym wymieszaniu, stanowiła zawiesinę starterową do szczepienia właściwej hodowli. 250 ml podłoża produkcyjnego o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części peptonu, 0,5 części $MgSO_4 \times 7H_2O$, 2,7 części Na_2HPO_4 , 1,15 części kwasu cytrynowego, zaszczepiono uzyskaną uprzednio zawiesiną starterową, użytą w ilości 5% v/v w stosunku do objętości podłoża i prowadzono hodowlę produkcyjną w bioreaktorach prostopadłościennych o wymiarach 60 cm x 40 cm x 6 cm (długość x szerokość x wysokość), w czasie 5 dni, w temperaturze 30°C.

W tym czasie na powierzchni zaszczepionych podłoży przyrastała błona celulozowa do grubości około 5–7 mm. Po zakończeniu inkubacji, błony celulozowe poddano oczyszczaniu. Proces oczyszczania polegał kolejno na płukaniu błon celulozowych w gorącej wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% wodnym roztworem wodorotlenku sodu w czasie 24 godzin, w temperaturze pokojowej, płukaniu w wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% roztworem wodnym kwasu octowego w czasie 24 godzin, ponow-

nym płukaniu w wodzie wodociągowej, płukaniu w wodzie destylowanej. Tak przygotowaną błonę, w postaci płata, poddano modyfikacji metodą zanurzeniową. W tym celu z otrzymanego płata błony wycięto prostokąty o wymiarach 8 cm x 2 cm, które umieszczono w kolbie wyposażonej w mieszadło magnetyczne, z funkcją grzania, w 500 ml oleju rzepakowego, w temperaturze pokojowej na czas 24 godzin. Następnie próbki zmodyfikowanej celulozy suszono w suszarce laboratoryjnej, w temperaturze 40°C w ciągu 24 godzin.

Tak zmodyfikowane próbki celulozy poddano statycznej analizie mechanicznej (Zwick) w celu obserwacji efektu uplastycznienia, spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera w celu określenia zawartości kwasów tłuszczowych oleju. Nadto przeprowadzono pomiary kątów zwilżania (goniometr).

Indeksy karbonylowe – bezwzględną ilość kwasów tłuszczowych w próbce zmodyfikowanej celulozy określono posługując się wzorami:

$$H_{C=O}(1741,26 \text{ cm}^{-1}) = 0,0186$$

$$H_{C-H}(2919,41 \text{ cm}^{-1}) = 0,0679$$

$$I = \frac{H_{C=O}}{H_{C-H}} = 0,273$$

w których oznaczają:

$H_{C=O}$ wysokość pasma przy liczbie falowej 1700 cm^{-1}

H_{C-H} wysokość pasma przy liczbie falowej 2900 cm^{-1}

Na rysunku (fig. 1) przedstawiono tablicę ilustrującą wyniki pomiarów kątów zwilżania jednej z próbek zmodyfikowanej celulozy, tablicę ilustrującą wyniki pomiarów właściwości mechanicznych trzech próbek zmodyfikowanej celulozy.

Przykład 2

Zawiesinę starterową przygotowano aktywując szczep *Komagataeibacter rhaeticus* K3, przechowywany w postaci zamrożonej w roztworze glicerolu, poprzez posiew redukcyjny na podłożu SH (podłożu Hestrin-Schramm) zestalonym 2% agarem, o składzie: w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części aminobaku, 2,7 części dwuwodorofosforanu sodu, 1,15 części kwasu cytrynowego oraz 0,5 części siarczanu magnezu oraz inkubację w czasie 3 dni, w temperaturze 30°C. Następnie dokonano transferu 1 kolonii aktywowanego szczepu do 5 ml podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego i poddano inkubacji przez 3 dni, w temperaturze 30°C. Nagromadzoną biomasę wraz z wyrosniętą błoną celulozową przeniesiono ilościowo do 100 ml podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego i inkubowano przez 3 dni, w temperaturze 30°C. Tak przygotowana zawiesina drobnoustrojów, po intensywnym wymieszaniu, stanowiła zawiesinę starterową do szczepienia właściwej hodowli. 250 ml podłoża produkcyjnego o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,7 części Na_2HPO_4 , 1,15 części kwasu cytrynowego zaszczepiono uzyskaną uprzednio zawiesiną starterową użytą w ilości 5% v/v w stosunku do objętości podłoża i prowadzono hodowlę produkcyjną w bioreaktorach prostopadłościennych o wymiarach 60 cm x 40 cm x 6 cm, w czasie 5 dni w temperaturze 30°C.

W tym czasie na powierzchni zaszczipionych podłoży przyrastała błona celulozowa do grubości około 5–7 mm. Po zakończeniu inkubacji, błony celulozowe poddano oczyszczaniu. Proces oczyszczania wytworzonych błon nanocelulozowych polegał kolejno na płukaniu w gorącej wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% wodnym roztworem wodorotlenku sodu w czasie 24 godzin w temperaturze pokojowej, płukaniu w wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% roztworem wodnym kwasu octowego w czasie 24 godzin, ponownym płukaniu w wodzie wodociągowej, płukaniu w wodzie destylowanej.

Tak przygotowaną błonę celulozy, w postaci płata, poddano modyfikacji metodą przesączania. W tym celu z otrzymanego płata błony wycięto prostokąty o wymiarach 8 cm x 2 cm, które umieszczano na lejku Büchnera w kolbie ssawkowej i przepuszczono przez każdy z nich 150 ml oleju lnianego w temperaturze pokojowej w czasie 24 godzin. Następnie próbki zmodyfikowanej celulozy suszono w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 40°C w ciągu 24 godzin.

Tak zmodyfikowane próbki celulozy poddano statycznej analizie mechanicznej (Zwick) w celu obserwacji efektu uplastycznienia. Nadto przeprowadzono pomiary kątów zwilżania (goniometr).

Na rysunku (fig. 2) przedstawiono tablicę ilustrującą wyniki pomiarów kąta zwilżania jednej z próbek zmodyfikowanej celulozy, tablicę ilustrującą wyniki pomiarów właściwości mechanicznych trzech próbek zmodyfikowanej celulozy.

Przykład 3

Błony celulozy przygotowano postępując jak w przykładzie 1.

Przygotowaną błonę celulozy, w postaci płata, poddano modyfikacji z wykorzystaniem ultradźwięków. W tym celu prostokąty wycięte z błony celulozy, o wymiarach 8 cm x 2 cm, umieszczono w zlewce, zalano 500 ml oleju z pestek winogron i umieszczono w myjce ultradźwiękowej. Ultradźwięki o częstotliwości 40 kHz włączano na 30 minut bez odstępu czasowego oraz w odstępach czasowych: 4 godziny, 8 godzin i 24 godziny od momentu pierwszego włączenia.

Tak zmodyfikowane próbki celulozy poddano statycznej analizie mechanicznej (Zwick) w celu obserwacji efektu uplastycznienia, spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera w celu określenia zawartości kwasów tłuszczowych oleju. Nadto przeprowadzono pomiary kątów zwilżania (goniometr).

Indeksy karbonylowe – bezwzględną ilość kwasów tłuszczowych w próbce zmodyfikowanej celulozy określono posługując się wzorami:

$$H_{C=O}(1751,53 \text{ cm}^{-1}) = 0,0060$$

$$H_{C-H}(2894,95 \text{ cm}^{-1}) = 0,0467$$

$$I = \frac{H_{C=O}}{H_{C-H}} \approx 0,128$$

w których $H_{C=O}$ i H_{C-H} mają wyżej podane znaczenie

Na rysunku (fig. 3) przedstawiono tablicę ilustrującą wyniki pomiarów kątów zwilżania jednej z próbek zmodyfikowanej celulozy, tablicę ilustrującą wyniki pomiarów właściwości mechanicznych czterech próbek zmodyfikowanej celulozy.

Przykład 4

Błony celulozy przygotowano jak w przykładzie 2.

Przygotowane błony celulozy poddano modyfikacji w roztworze oleju lnianego i kurkuminy. W tym celu przygotowane próbki celulozy, w postaci prostokątów o wymiarach 8 cm x 2 cm, umieszczano w kolbie zawierającej 150 ml oleju lnianego z dodatkiem 5 ml roztworu kurkuminy, o stężeniu 3%, wyposażonej w chłodnicę zwrotną, na czas 24 godzin, w temperaturze 40°C.

Tak zmodyfikowane próbki celulozy poddano statycznej analizie mechanicznej (Zwick) w celu obserwacji efektu uplastycznienia. Nadto przeprowadzono pomiary kątów zwilżania (goniometr).

Na rysunku (fig. 4) przedstawiono tablicę ilustrującą wyniki pomiarów kąta zwilżania dwóch próbek zmodyfikowanej celulozy, tablicę ilustrującą wyniki pomiarów właściwości mechanicznych trzech próbek zmodyfikowanej celulozy.

Przykład 5

Błony celulozy przygotowano jak w przykładzie 2.

Przygotowane błony celulozy poddano modyfikacji w roztworze oleju winogronowego i aminokwasu – L-glutaminy. W tym celu przygotowane próbki celulozy, w postaci prostokątów o wymiarach 8 cm x 2 cm, umieszczano w kolbie zawierającej 150 ml oleju winogronowego z dodatkiem 5 g L-glutaminy, wyposażonej w chłodnicę zwrotną, na czas 24 godzin, w temperaturze 40°C.

Za pomocą statycznej analizy mechanicznej (Zwick) potwierdzono efekt uplastycznienia tak zmodyfikowanych próbek celulozy.

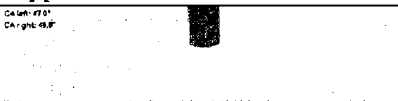

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania modyfikowanej bakteryjnej celulozy w formie bioskóry, z celulozy bakteryjnej otrzymanej w drodze hodowli stacjonarnej szczepu bakterii z rodzaju *Komagataeibacter*, w której szczep bakterii *Komagataeibacter*, przechowywany w postaci zamrożonej w roztworze glicerolu, aktywuje się poprzez posiew redukcyjny na podłożu zestalonym 2% agarem,

- o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części aminobaku, 2,7 części dwuwodorofosforanu sodu, 1,15 części kwasu cytrynowego, 0,5 części siarczanu magnezu oraz inkubację w czasie 3 dni, w temperaturze 30°C, następnie przenosi się jedną kolonię zaktywowanych bakterii do 5 ml płynnego podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego i po inkubacji w czasie dalszych 3 dni w temperaturze 30°C nagromadzoną biomasę wraz z tworzoną błoną celulozową przenosi się do 100 ml podłoża inokularnego o składzie jakościowym i ilościowym jak skład podłoża do posiewu redukcyjnego i prowadzi inkubację w czasie 3 dni w temperaturze 30°C, po czym tak przygotowaną zawiesiną inokulum, po intensywnym jej wymieszaniu, zaszczebia się podłoże hodowli produkcyjnej o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 5 części ekstraktu drożdżowego, 5 części peptonu, 0,5 części $MgSO_4 \times 7H_2O$, 2,7 części Na_2HPO_4 , 1,15 części kwasu cytrynowego, ewentualnie wzbogacone kwasem askorbinowym dodanym w ilości 3%, korzystnie 0,5% masy podłoża lub podłoże produkcyjne o składzie w częściach wagowych: 20–40 części przemysłowego produktu ubocznego lub odpadowego zawierającego niezbędną ilość cukrów, 8 części ekstraktu drożdżowego, 7 części peptonu, 1 część $MgSO_4 \times 7H_2O$, 4 części Na_2HPO_4 , 2 części kwasu cytrynowego, ewentualnie wzbogacone dodatkowo kwasem askorbinowym dodanym w ilości 5%, korzystnie 0,5% masy podłoża, stosując 2–10% v/v, korzystnie 5% v/v inokulum w stosunku do objętości podłoża i prowadzi hodowlę produkcyjną w warunkach stacjonarnych lub wstrząsanych, w czasie 5–12 dni, korzystnie 7 dni, w temperaturze 28–32°C, korzystnie 30°C i po zakończeniu hodowli produkcyjnej błonę celulozową powstałą na powierzchni podłoża poddaje się oczyszczaniu polegającemu kolejno na płukaniu w gorącej wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% wodnym roztworem wodorotlenku sodu w temperaturze 100°C, w czasie 1 godziny lub 1–2% wodnym roztworem tego wodorotlenku w czasie 20–24 godzin, w temperaturze pokojowej, płukaniu w wodzie wodociągowej, traktowaniu 1% roztworem wodnym kwasu octowego w czasie 20–24 godzin, ponownym płukaniu w wodzie wodociągowej i następnie w wodzie destylowanej, **znamienny tym**, że wytworzoną celulozę bakteryjną poddaje się modyfikacji przy użyciu oleju roślinnego, oleju roślinnego z dodatkiem barwnika spożywczego lub oleju roślinnego z dodatkiem aminokwasu, stosując 150 ml oleju, 5 ml roztworu barwnika o stężeniu 1–5% lub; 1–8 g aminokwasu na płat modyfikowanej celulozy o powierzchni 16 cm², metodą zanurzeniową, przesączania lub z wykorzystaniem ultradźwięków o częstotliwości 40 kHz, w temperaturze pokojowej w czasie 24 godzin, po czym po uformowaniu w płyty, suszy się w temperaturze 40°C, w czasie 24 godzin.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się szczep bakterii *Komagataeibacter hamenii* S11 lub *Komagataeibacter rhaeticus* K3.
 3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się olej lniany, rzepakowy, słonecznikowy, sojowy lub z pestek winogron.
 4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako barwnik spożywczy stosuje się kurkuminę.
 5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako aminokwas stosuje się L-glutaminę.

Rysunki

Fig. 1

Próbka	Zdjęcie	Średnia kątów [°]	Odchylenie [°]
BNC_1_RZ_woda		46,08	3,85
		24,09	3,38

*Próbka**BNC_1_RZ*

T_{Fmax} [MPa]	E_{Fmax} [%]	TS [MPa]	E_b [%]
11,8	28,6	7,55	42,4
22,1	15,7	21,8	15,8
14,1	9,3	9,07	10,4

Symbole: T_{Fmax} , E_{Fmax} , T_s , E_b mają wyżej podane znaczenia:


T_{Fmax} [MPa] – maksymalne naprężenie przeniesione przez próbkę,

E_{Fmax} [%] – maksymalne wydłużenie próbki w chwili zerwania,

TS [MPa] – wytrzymałość na rozciąganie,

E_b [%] – względne wydłużenie odcinka pomiarowego w chwili zerwania

Fig. 2

Próbka	Zdjęcie	Średnia kątów [°]
BNC_2_L_woda		52,72



• T_{Fmax} [MPa] E_{Fmax} [%] TS [MPa] E_b [%]

*Próbka**BNC_2_L*

49,2	6,5	9,83	8,8
104	6,7	104	6,7
74,1	7,8	74,1	7,8

Symbole: SE_{100} , SE_{200} , SE_{300} , T_{Fmax} , T_s , E_b mają wyżej podane znaczenia.



Fig. 3

Próbka	Zdjęcie	Średnia kątów [°]	Odchylenie [°]
BNC_3_RZ_woda		66,77	3,44
		41,54	3,12

Próbka	T_{Fmax} [MPa]	E_{Fmax} [%]	TS [MPa]	E_b [%]
BNC_3_RZ	11,3	12,8	10,2	18,9
	6,41	10,9	2,25	17,1
	23,5	15,0	22,4	15,2
	26,2	11,9	24,42	12,2

Symbole: SE₁₀₀, SE₂₀₀, SE₃₀₀, T_{Fmax}, T_s, E_b mają wyżej podane znaczenia.

Fig. 4

Próbka	Zdjęcie	Średnia kątów [°]	Odchylenie [°]
BNC_2_L_K_woda		53,50	1,43
BNC_4_L_K_woda		49,29	1,24

Próbka	T_{Fmax} [MPa]	E_{Fmax} [%]	TS [MPa]	E_b [%]
BNC_2_LK	10,2	14,4	2,04	24,1
	6,84	19,2	1,37	45,2
	6,59	41,3	1,32	56,6